# FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin 5/6

Clone D5/16 B4

**Ready-to-Use**

(Dako Autostainer/Autostainer Plus)

**Code IS780**

## ENGLISH

**Intended use**

For in vitro diagnostic use.

FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin 5/6, Clone D5/16 B4, Ready-to-Use (Dako Autostainer/Autostainer Plus), is intended for use in immunohistochemistry together with Dako Autostainer/ Autostainer Plus instruments. This antibody is useful for the distinction between low differentiated squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. Furthermore, the expression of CK5 by mesothelium makes this antibody valuable in the differentiation between epithelioid mesothelioma and lung carcinoma (1) when used together with other antibodies against mesothelioma markers, such as calretinin and thrombomodulin (2). Anti-CK 5/6 has also been found useful in the differential diagnosis of atypical proliferations of the breast (3). Antibodies to CK5/6 may also be useful as an aid in the differentiation between benign and malignant prostate glands (4). Differential identification is aided by the results from a panel of antibodies. The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

**Summary and explanation**

Cytokeratins are alpha-type fibrous polypeptides with a diameter of 7-11 nm. They are important components of the cytoskeleton in almost all epithelial cells as well as in some non-epithelial cell types. Cytokeratins are, generally, held to be the most ubiquitous markers of epithelial differentiation, and, so far, 20 distinct types numbered by Moll (5, 6) have been revealed. The CK5 is a high molecular weight, basic type of cytokeratin, with a molecular mass of 58 kDa, expressed in the basal, the intermediate and the superficial cell layers of stratified epithelia as well as in transitional epithelia, complex epithelia, and in mesothelial cells and mesothelioma. CK5 has not, with few exceptions, been found in simple epithelia and in non-epithelial cells. CK6 is also a high molecular weight, basic type of cytokeratin, with a molecular mass of 56 kDa, expressed by proliferating squamous epithelium often paired with CK16 (48 kDa) (5, 6)

Refer to Dako's *General Instructions for Immunohistochemical Staining* or the detection system instructions of IHC procedures for: 1) Principle of Procedure, 2) Materials Required, Not Supplied, 3) Storage, 4) Specimen Preparation, 5) Staining Procedure, 6) Quality Control, 7) Troubleshooting, 8) Interpretation of Staining, 9) General Limitations.

**Reagent provided**

Ready-to-use monoclonal mouse antibody provided in liquid form in a buffer containing stabilizing protein and 0.015 mol/L sodium azide.

Clone: D5/16 B4. Isotype: IgG1, kappa.

**Immunogen**

Isolated cytokeratin 5.

**Specificity**

In Western blotting of cytoskeletal preparations of epidermis and non-keratinizing epithelium, the antibody labels cytokeratin 5. It also labels cytokeratin 6 and weakly labels cytokeratin 4. No cross-reaction with cytokeratins 1, 7, 8, 10, 13/14, 18 and 19 has been found.

**Precautions**

1. For professional users.

2. This product contains sodium azide ($NaN_3$), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.

3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.

4. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.

5. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

**Storage**

Store at 2–8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact Dako Technical Support.

**Specimen preparation including materials required but not supplied**

The antibody can be used for labeling formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Tissue specimens should be cut into sections of approximately 4 µm.

Pre-treatment with heat-induced epitope retrieval (HIER) is required using Dako PT Link (Code PT100/PT101). For details, please refer to the PT Link User Guide. Optimal results are obtained by pretreating tissues using EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code K8010/K8004).

Paraffin-embedded sections: Pre-treatment of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections is recommended using the 3-in-1 specimen preparation procedure for Dako PT Link. Follow the pre-treatment procedure outlined in the package insert for EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code K8010/K8004). Note: After staining the sections must be dehydrated, cleared and mounted using permanent mounting medium.

Deparaffinized sections: Pre-treatment of deparaffinized formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections is recommended using Dako PT Link and following the same procedure as described for paraffin-embedded sections. After staining the slides should be mounted using aqueous or permanent mounting medium.

The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunohistochemical staining procedure. For greater adherence of tissue sections to glass slides, the use of FLEX IHC Microscope Slides (Code K8020) is recommended.

**Staining procedure including materials required but not supplied**

The recommended visualization system is EnVision™ FLEX, High pH, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8010). The staining steps and incubation times are pre-programmed into the software of Dako Autostainer/Autostainer Plus instruments, using the following protocols:

Template protocol: FLEXRTU2 (200 µL dispense volume) or FLEXRTU3 (300 µL dispense volume)

Autoprogram: CK56 (without counterstaining) or CK56H (with counterstaining)

The Auxiliary step should be set to "rinse buffer" in staining runs with ≤10 slides. For staining runs with >10 slides the Auxiliary step should be set to "none". This ascertains comparable wash times.

All incubation steps should be performed at room temperature. For details, please refer to the Operator's Manual for the dedicated instrument. If the protocols are not available on the used Dako Autostainer instrument, please contact Dako Technical Services.

Optimal conditions may vary depending on specimen and preparation methods, and should be determined by each individual laboratory. If the evaluating pathologist should desire a different staining intensity, a Dako Application Specialist/Technical Service Specialist can be contacted for information on re-programming of the protocol.



Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17

Verify that the performance of the adjusted protocol is still valid by evaluating that the staining pattern is identical to the staining pattern described in "Performance characteristics".

Counterstaining in hematoxylin is recommended using EnVision™ FLEX Hematoxylin, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8018). Non-aqueous, permanent mounting medium is recommended.

Positive and negative controls should be run simultaneously using the same protocol as the patient specimens. The positive control tissue should include tonsil and prostate and the cells/structures should display reaction patterns as described for these tissues in "Performance characteristics" in all positive specimens. The recommended negative control reagent is FLEX Negative Control, Mouse, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code IS750).

**Staining interpretation**

Cells labeled by the antibody display cytoplasmic staining.

**Performance characteristics**

Normal tissues: The antibody labels stratified squamous epithelia. In complex epithelia, the basal cells in most cases express CK5. Simple epithelia and non-epithelial cells, generally, are not labeled by the antibody. In tonsil, the basal squamous epithelial cells show a moderate to strong staining reaction. In prostate, the basal cells show a weak to moderate staining reaction, whereas no or only focal reaction of the secretory cells is seen.

Abnormal tissues: In formalin-fixed, paraffin-embedded tissues the antibody labeled 56/61 (92%) of epithelioid pleural mesotheliomas, while 9/63 (14%) of metastatic adenocarcinomas were labeled. Reactive mesothelium was also labeled (2). In another study (1), all of 23 mesotheliomas with epithelioid or acinar differentiation were strongly labeled by the antibody, whilst labeling in the sarcomatoid areas of tumors with a mixed morphology was weak or absent. One case of sarcomatoid mesothelioma gave an equivocal reaction, whereas mesotheliomas of desmoplastic or sarcomatoid type were negative. Of 27 secondary adenocarcinomas of the pleura, 22 were negative, 4 weak or equivocal, and 1 focally positive. High levels of cytokeratin 5/6 positivity in ductal hyperplasia of usual type, and negative staining of most cases of atypical ductal hyperplasia and ductal carcinoma in situ, have been demonstrated with the antibody (3). Testing of the antibody on prostate hyperplasia showed positive reaction in the basal cells, while the antibody failed to stain malignant prostatic epithelium in prostate adenocarcinoma.

## FRANÇAIS

**Utilisation prévue**

Pour utilisation diagnostique *in vitro.*

FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin 5/6, Clone D5/16 B4, Ready-to-Use, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) est destiné à une utilisation en immunohistochimie avec les instruments Dako Autostainer/Autostainer Plus. Cet anticorps permet de distinguer les adénocarcinomes des carcinomes à cellules squameuses peu différenciés. De plus, l'expression de la CK5 par le mésothélium rend cet anticorps utile dans la différenciation du mésothéliome épithélioïde et du carcinome pulmonaire (1) lorsqu'il est associé à d'autres anticorps dirigés contre les marqueurs du mésothéliome, tels que la calrétinine et la thrombomoduline (2). L'anti-CK 5/6 s'est également avéré utile dans le diagnostic différentiel des prolifératıons mammaires atypiques (3). Les anticorps dirigés contre la CK5/6 peuvent également s'avérer utiles dans la différenciation des glandes prostatiques bénignes et malignes (4). L'identification différentielle est facilitée par les résultats provenant d'un panel d'anticorps. L'interprétation clinique de toute coloration ou son absence doit être complétée par des études morphologiques en utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée en fonction des antécédents cliniques du patient et d'autres tests diagnostiques par un pathologiste qualifié.

**Résumé et explication**

Les cytokératines sont des polypeptides fibreux de type alpha dont le diamètre est de 7 à 11 nm. Il s'agit de composants importants du cytosquelette de la quasi-totalité des cellules épithéliales ainsi que de certains types de cellules non épithéliales. Les cytokératines sont, généralement, considérées comme les marqueurs les plus répandus de la différenciation épithéliale et, jusqu'à présent, 20 types distincts classifiés par Moll (5, 6) ont été identifiés. La CK 5 est un type basique de cytokératine de poids moléculaire élevé, dont la masse moléculaire est de 58 kDa, exprimée dans les couches de cellules basales, intermédiaires et superficielles des épithéliums stratifiés ainsi que des épithéliums transitionnels, des épithéliums complexes, des cellules mésothéliales et des mésothéliomes. La CK 5 n'est pas, à quelques rares exceptions, présente dans les épithéliums simples et dans les cellules non épithéliales. La CK 6 est également un type basique de cytokératine de poids moléculaire élevé, dont la masse moléculaire est de 56 kDa, exprimée par l'épithélium squameux prolifèrant souvent associé à la CK 16 (48 kDa) (5, 6).

Se référer aux *Instructions générales de coloration immunohistochimique* de Dako ou aux instructions du système de détection relatives aux procédures IHC pour plus d'informations concernant les points suivants : 1) Principe de procédure, 2) Matériels requis mais non fournis, 3) Conservation, 4) Préparation des échantillons, 5) Procédure de coloration, 6) Contrôle qualité, 7) Dépannage, 8) Interprétation de la coloration, 9) Limites générales.

**Réactifs fournis**

Anticorps monoclonal de souris prêt à l'emploi fourni sous forme liquide dans un tampon contenant une protéine stabilisante et 0,015 mol/L d'azide de sodium.

Clone : D5/16 B4. Isotype : IgG1, kappa.

**Immunogène**

Cytokératine 5 isolée.

**Spécificité**

Lors d'analyses par Western blot de préparations cytosquelettiques d'épiderme et d'épithélium non kératinisant, l'anticorps marque la cytokératine 5. Il marque également la cytokératine 6 et marque faiblement la cytokératine 4. Aucune réaction croisée avec les cytokératines 1, 7, 8, 10, 13/14, 18 et 19 n'a été constatée.

**Précautions**

1. Pour utilisateurs professionnels.

2. Ce produit contient de l'azide de sodium ($NaN_3$), produit chimique hautement toxique dans sa forme pure. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, l'azide de sodium peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations et former des accumulations d'azides métalliques hautement explosifs. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.

3. Comme avec tout produit d'origine biologique, des procédures de manipulation appropriées doivent être respectées.

4. Porter un vêtement de protection approprié pour éviter le contact avec les yeux et la peau.

5. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales et nationales.

**Conservation**

Conserver entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur le flacon. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Il n'y a aucun signe évident indiquant l'instabilité de ce produit. Par conséquent, des contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que les échantillons de patient. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut être expliquée par un changement des procédures du laboratoire, et en cas de suspicion d'un problème lié à l'anticorps, contacter l'assistance technique de Dako.

**Préparation des échantillons y compris le matériel requis mais non fourni**

L'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes de tissus inclus en paraffine et fixés au formol. L'épaisseur des coupes d'échantillons de tissu doit être d'environ 4 µm.

Un prétraitement avec démasquage d'épitope induit par la chaleur (HIER) est nécessaire avec le Dako PT Link (Réf. PT100/PT101). Pour plus de détails, se référer au Guide d'utilisation du PT Link. Des résultats optimaux sont obtenus en prétraitant les tissus à l'aide de la EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Réf. K8010/K8004).

Coupes incluses en paraffine : le prétraitement des coupes tissulaires fixées au formol et incluses en paraffine est recommandé à l'aide de la procédure de préparation d'échantillon 3-en-un pour le Dako PT Link. Suivre la procédure de prétraitement indiquée dans la notice de la EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Réf. K8010/K8004). Remarque : après coloration, les coupes doivent être déshydratées, lavées et montées à l'aide d'un milieu de montage permanent.

Coupes déparaffinées : le prétraitement des coupes tissulaires déparaffinées, fixées au formol et incluses en paraffine, est recommandé à l'aide du Dako PT Link, en suivant la même procédure que pour les coupes incluses en paraffine. Après coloration, un montage aqueux ou permanent des lames est recommandé.

Les coupes de tissus ne doivent pas sécher lors du traitement ni lors de la procédure de coloration immunohistochimique suivante. Pour une meilleure adhérence des coupes de tissus sur les lames de verre, il est recommandé d'utiliser des lames FLEX IHC Microscope Slides (Réf. K8020).



Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17

**Procédure de coloration y compris le matériel requis mais non fourni**

Le système de visualisation recommandé est le EnVision™ FLEX, High pH, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. K8010). Les étapes de coloration et d'incubation sont préprogrammées dans le logiciel des instruments Dako Autostainer/Autostainer Plus, à l'aide des protocoles suivants :

Protocole modèle : FLEXRTU2 (volume de distribution de 200 µL) ou FLEXRTU3 (volume de distribution de 300 µL)

Autoprogram : CK56 (sans contre-coloration) ou CK56H (avec contre-coloration).

L'étape Auxiliary doit être réglée sur « rinse buffer » lors des cycles de coloration avec ≤10 lames. Pour les cycles de coloration de >10 lames, l'étape Auxiliary doit être réglée sur « none ». Cela garantit des temps de lavage comparables.

Toutes les étapes d'incubation doivent être effectuées à température ambiante. Pour plus de détails, se référer au Manuel de l'opérateur spécifique à l'instrument. Si les protocoles ne sont pas disponibles sur l'instrument Dako Autostainer utilisé, contacter le service technique de Dako.

Les conditions optimales peuvent varier en fonction du prélèvement et des méthodes de préparation, et doivent être déterminées par chaque laboratoire individuellement. Si le pathologiste qui réalise l'évaluation désire une intensité de coloration différente, un spécialiste d'application/spécialiste du service technique de Dako peut être contacté pour obtenir des informations sur la re-programmation du protocole. Vérifier que l'exécution du protocole modifié est toujours valide en vérifiant que le schéma de coloration est identique au schéma de coloration décrit dans les « Caractéristiques de performance ».

Il est recommandé d'effectuer une contre-coloration à l'aide de EnVision™ FLEX Hematoxylin, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. K8018). L'utilisation d'un milieu de montage permanent non aqueux est recommandée.

Des contrôles positifs et négatifs doivent être réalisés en même temps et avec le même protocole que les échantillons du patient. Les tissus de contrôle positifs doivent comprendre les amygdales et la prostate et les cellules/structures doivent présenter des schémas de réaction tels que décrits pour ces tissus dans les « Caractéristiques de performance » dans tous les échantillons positifs. Le contrôle négatif recommandé est le FLEX Negative Control, Mouse, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. IS750).

**Interprétation de la coloration**

Les cellules marquées par l'anticorps présentent une coloration cytoplasmique.

**Caractéristiques de performance**

Tissus sains : L'anticorps marque les épithéliums squameux stratifiés. Dans les épithéliums complexes, les cellules basales expriment, dans la plupart des cas, la CK 5. Généralement, les épithéliums simples et les cellules non épithéliales ne sont pas marqués par l'anticorps. Dans l'amygdale, les cellules épithéliales squameuses basales indiquent une coloration modérée à forte. Dans la prostate, les cellules basales présentent une coloration faible à modérée, alors qu'aucune réaction ou seulement une coloration focale des cellules sécrétoires est observée.

Tissus tumoraux : Dans les tissus fixés au formol et inclus en paraffine, l'anticorps marque 56/61 (92 %) des mésothéliomes pleuraux épithélioïdes, alors que 9/63 (14 %) des adénocarcinomes métastatiques ont été marqués. Le mésothélium réactif a également été marqué (2). Dans une autre étude (1), chacun des 23 mésothéliomes avec différenciation épithélioïde ou acinaire a été fortement marqué par l'anticorps, alors que le marquage des zones sarcomatoïdes des tumeurs présentant une morphologie mixte était faible ou absent. Un cas de mésothéliome sarcomatoïde a présenté une réaction équivoque, alors que les mésothéliomes de type desmoplastique ou sarcomatoïde étaient négatifs. Sur 27 adénocarcinomes secondaires de la plèvre, 22 étaient négatifs, 4 ont présenté une coloration faible ou équivoque et 1 une réaction positive de manière focalisée. Des taux élevés de positivité aux cytokératines 5/6 dans l'hyperplasie canalaire typique, et une coloration négative de la plupart des cas d'hyperplasie canalaire atypique et de carcinome canalaire *in situ*, ont été révélé à l'aide de l'anticorps (3). Le test de l'anticorps sur l'hyperplasie prostatique a présenté une réaction positive au niveau des cellules basales, alors que l'anticorps n'a pas coloré l'épithélium prostatique malin dans l'adénocarcinome de la prostate.

## DEUTSCH

**Zweckbestimmung**

Zur In-vitro-Diagnostik.

FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin 5/6, Clone D5/16 B4, Ready-to-Use (Dako Autostainer/Autostainer Plus) ist zur Verwendung in der Immunhistochemie in Verbindung mit Dako Autostainer/Autostainer Plus-Geräten bestimmt. Dieser Antikörper dient zur Unterscheidung zwischen wenig differenzierten Plattenepithelkarzinomen und Adenokarzinomen. Darüber hinaus ist dieser Antikörper aufgrund der Expression von CK5 durch das Mesothel bei der Differenzierung zwischen epitheloiden Mesotheliom und Lungenkarzinom (1) nützlich, wenn er zusammen mit anderen Antikörpern gegen Mesotheliommarker, z.B. Calretinin und Thrombomodulin, eingesetzt wird (2). Anti-CK 5/6 hat sich ebenfalls bei der Differenzialdiagnose atypischer Proliferationen der Brust als nützlich erwiesen (3). ). Antikörper auf CK5/6 dienen auch als Unterstützung zur Abgrenzung von benignen und malignen Prostatadrüsen (4). Die Differenzialdiagnose wird durch die Ergebnisse eines Antikörper-Panels unterstützt. Die klinische Auswertung einer eventuell eintretenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit ordnungsgemäßen Kontrollen ergänzt werden und von einem qualifizierten Pathologen unter Berücksichtigung der Krankengeschichte und anderer Diagnostiktests des Patienten vorgenommen werden.

**Zusammenfassung und Erklärung**

Zytokeratine sind fibröse Polypeptide des Alphatyps mit einem Durchmesser von 7–11 nm. Sie stellen in beinahe allen Epithelzellen wie auch in einigen Nicht-Epithelzellen wichtige Komponenten des Zellgerüsts dar. Zytokeratine gelten generell als die am weitesten verbreiteten Marker der Epitheldifferenzierung und bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt wurden 20 deutlich unterschiedene Typen nachgewiesen und von Moll (5, 6) nummeriert. Das CK5 ist ein Grundtyp-Zytokeratin mit einem hohen Molekulargewicht von 58 kDa, das sowohl in den basalen, intermediären und oberflächlichen Zellschichten des stratifizierten Epithels wie auch im Übergangsepithel, komplexem Epithel sowie in Mesothelzellen und im Mesotheliom exprimiert wird. CK5 wurde, von wenigen Ausnahmen abgesehen, in einfachen Epithelien und Nicht-Epithelzellen nicht nachgewiesen. CK6 ist ebenfalls ein Grundtyp-Zytokeratin mit hohem Molekulargewicht von 56 kDa, das durch proliferierendes Plattenepithel, das oftmals mit CK16 (48 kDa) gepaart vorliegt, exprimiert wird (5, 6)).

Folgende Angaben bitte den *Allgemeinen Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung* von Dako oder den Anweisungen des Detektionssystems für IHC-Verfahren entnehmen: 1) Verfahrensprinzip, 2) Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien, 3) Aufbewahrung, 4) Vorbereitung der Probe, 5) Färbeverfahren, 6) Qualitätskontrolle, 7) Fehlersuche und -behebung, 8) Auswertung der Färbung, 9) Allgemeine Beschränkungen.

**Geliefertes Reagenz**

Gebrauchsfertiger, monoklonaler Maus-Antikörper in flüssiger Form in einem Puffer, der stabilisierendes Protein und 0,015 mol/L Natriumazid enthält.

Klon: D5/16 B4. Isotyp: IgG1, Kappa.

**Immunogen**

Isoliertes Zytokeratin 5.

**Spezifität**

Beim Western Blotting von Zellgerüstpräparaten aus Epidermis und nicht-keratinisierendem Epithel markiert der Antikörper Zytokeratin 5 und 6. Zytokeratin 4 wird schwach markiert und mit den Zytokeratinen 1, 7, 8, 10, 13/14, 18 und 19 wurde keine Kreuzreaktion nachgewiesen.

**Vorsichtsmaßnahmen**

1. Nur für Fachpersonal bestimmt.

2. Dieses Produkt enthält Natriumazid ($NaN_3$), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Natriumazid kann auch in als ungefährlich eingestuften Konzentrationen mit Blei- und Kupferrohren reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Nach der Entsorgung stets mit viel Wasser nachspülen, um Metallazidansammlungen in den Leitungen vorzubeugen.

3. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden.

4. Geeignete Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.

5. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, bundesstaatlichen und staatlichen Richtlinien zu entsorgen.

**Lagerung**

Bei 2–8 °C aufbewahren. Nach Ablauf des auf dem Fläschch en aufgedruckten Verfalldatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien unter anderen als den angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen diese Bedingungen vom Benutzer validiert werden. Es gibt keine offensichtlichen Anzeichen für eine eventuelle Produktinstabilität. Positiv- und Negativkontrollen sollten daher zur gleichen Zeit wie die Patientenproben getestet werden. Falls es zu einer unerwarteten Färbung kommt, die sich nicht durch Unterschiede bei Laborverfahren erklären lässt und auf ein Problem mit dem Antikörper hindeutet, ist der technische Kundendienst von Dako zu verständigen.

**Vorbereitung der Probe und erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien**

Der Antikörper eignet sich zur Markierung von formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeschnitten. Gewebeproben sollten in Schnitte von ca. 4 µm Stärke geschnitten werden.

Die Vorbehandlung durch hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER) mit Dako PT Link (Code-Nr. PT100/PT101) ist erforderlich. Weitere Informationen hierzu siehe PT Link-Benutzerhandbuch. Optimale Ergebnisse können durch Vorbehandlung der Gewebe mit EnVision™ FLEX



Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17

Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code-Nr. K8010/K8004) erzielt werden.

Paraffineingebettete Schnitte: Die Vorbehandlung der formalinfixierten, paraffineingebetteten Schnitte mit dem 3-in-1-Probenvorbereitungsverfahren für Dako PT Link wird empfohlen. Vorbehandlung gemäß der Beschreibung in der Packungsbeilage für EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code-Nr. K8010/K8004) durchführen. Hinweis: Nach dem Färben müssen die Schnitte dehydriert, geklärt und mit permanentem Einbettmedium auf den Objektträger aufgebracht werden.

Entparaffinierte Schnitte: Eine Vorbehandlung der entparaffinierten, formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitte mit Dako PT Link nach demselben Verfahren, wie für die paraffineingebetteten Schnitte beschrieben, wird empfohlen. Die Objektträger nach dem Färben mit einem wässrigen oder permanenten Einbettmedium bedecken.

Die Gewebeschnitte dürfen während der Behandlung oder des anschließenden immunhistochemischen Färbeverfahrens nicht austrocknen. Zur besseren Haftung der Gewebeschnitte an den Glasobjektträgern wird die Verwendung von FLEX IHC Microscope Slides (Code-Nr. K8020) empfohlen.

**Färbeverfahren und erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien**

Das empfohlene Visualisierungssystem ist EnVision™ FLEX, High pH (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K8010). Die Färbeschritte und Inkubationszeiten sind in der Software der Dako Autostainer/Autostainer Plus-Geräte mit den folgenden Protokollen vorprogrammiert:

Matrix-Protokoll: FLEXRTU2 (200 µL Abgabevolumen) oder FLEXRTU3 (300 µL Abgabevolumen)

Autoprogram: CK56 (ohne Gegenfärbung) oder CK56H (mit Gegenfärbung)

Bei Färbedurchläufen mit höchstens 10 Objektträgern sollte der „Zusatz"-Schritt auf „Pufferspülgang" eingestellt werden. Für Färbedurchläufe mit mehr als 10 Objektträgern den „Zusatz"-Schritt auf „Keine" einstellen. Dieses gewährleistet vergleichbare Waschzeiten.

Alle Inkubationsschritte sollten bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Nähere Einzelheiten bitte dem Benutzerhandbuch für das jeweilige Gerät entnehmen. Wenn die Färbeprotokolle auf dem verwendeten Dako Autostainer-Gerät nicht verfügbar sind, bitte den Technischen Kundendienst von Dako verständigen.

Optimale Bedingungen können je nach Probe und Präparationsverfahren unterschiedlich sein und sollten vom jeweiligen Labor selbst ermittelt werden. Falls der beurteilende Pathologe eine andere Färbungsintensität wünscht, kann ein Anwendungsspezialist oder Kundendiensttechniker von Dako bei der Neuprogrammierung des Protokolls helfen. Die Leistung des angepassten Protokolls muss verifiziert werden, indem gewährleistet wird, dass das Färbemuster mit dem unter „Leistungsmerkmale" beschriebenen Färbemuster identisch ist.

Die Gegenfärbung in Hämatoxylin sollte mit EnVision™ FLEX Hematoxylin (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K8018) ausgeführt werden. Empfohlen wird ein nichtwässriges, permanentes Fixiermittel.

Positiv- und Negativkontrollen sollten zur gleichen Zeit und mit demselben Protokoll wie die Patientenproben getestet werden. Das positive Kontrollgewebe sollte Mandel- und Prostatagewebe enthalten und die Zellen/Strukturen müssen in allen positiven Proben die für dieses Gewebe unter „Leistungsmerkmale" beschriebenen Reaktionsmuster aufweisen. Das empfohlene Negativ-Kontrollreagenz ist FLEX Negative Control, Mouse (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. IS750).

**Auswertung der Färbung**

Mit diesem Antikörper markierte Zellen weisen ein zytoplasmatisches Färbemuster auf.

**Leistungsmerkmale**

Gesundes Gewebe: Der Antikörper markiert stratifiziertes Plattenepithel. In komplexen Epithelien erfolgt eine CK5-Expression durch die Basalzellen. Einfache Epithelien und Nicht-Epithelzellen werden generell durch den Antikörper nicht markiert. In Mandelgewebe weisen die Plattenepithelzellen eine mäßige bis starke Färbereaktion auf. In Prostatagewebe weisen die Basalzellen eine schwache bis mäßige Färbereaktion auf, während in den sekretorischen Zellen keine oder eine nur fokale Reaktion zu beobachten ist.

Pathologisches Gewebe: In formalinfixierten, paraffineingebetteten Geweben markiert der Antikörper 56 von 61 (92 %) Fällen epitheloider pleuraler Mesotheliome, während nur 9 von 63 (14 %) metastatischen Adenokarzinomen markiert wurden. Reaktives Mesothelium wurde ebenfalls markiert (2). In einer anderen Studie (1) wurden alle 23 Mesotheliome mit epitheloider oder azinärer Differenzierung durch den Antikörper stark markiert, während die Färbung in den sarkomatoiden Bereichen von Tumoren mit gemischter Morphologie schwach oder nicht vorhanden war. In einem Fall eines sarkomatoiden Mesothelioms war die Reaktion nicht eindeutig. Mesotheliome des desmoplastischen oder sarkomatoiden Typs waren negativ. Von 27 sekundären Adenokarzinomen der Pleura waren 22 negativ, 4 schwach oder nicht eindeutig und 1 fokal positiv. Mit dem Antikörper wurden hohe Zytokeratinspiegel (5 von 6 Positivität) bei der typischen duktalen Hyperplasie und negative Färbung der meisten Fälle von atypischer duktaler Hyperplasie und duktalem In-situ-Karzinom nachgewiesen (3). Antikörpertests auf Prostatahyperplasie ergaben in den Basalzellen positive Reaktionen, während der Antikörper maligne Prostataepithelzellen in Adenokarzinomen der Prostata nicht anfärbte.

**References/ Références/ Literatur**


1. Clover J, Oates J, Edwards C. Anti-cytokeratin 5/6: a positive marker for epithelioid mesothelioma. Histopathology 1997; 31:140-3.
2. Cury PM, Butcher DN, Fisher C, Corrin B, Nicholson AG. Value of the mesothelium-associated antibodies thrombomodulin, cytokeratin 5/6, calretinin, and CD44H in distinguishing epithelioid pleural mesothelioma from adenocarcinoma metastatic to the pleura. Mod Pathol 2000; 13:107-12.
3. Otterbach F, Bankfalvi A, Bergner S, Decker T, Krech R, Boecker W. Cytokeratin 5/6 immunohistochemistry assists the differential diagnosis of atypical proliferations of the breast. Histopathology 2000; 37:232-40.
4. Abrahams NA, Ormsby AH, Brainard J. Validation of cytokeratin 5/6 as an effective substitute for keratin 903 in the differentiation of benign from malignant glands in prostate needle biopsies. Histopathology 2002; 41:35-41.
5. Moll R, Franke WW, Schiller DL. The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. Cell 1982; 31:11-24.
6. Moll R, Löwe A, Laufer J, Franke WW. Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. Am J Pathol 1992; 140:427-47.


**Explanation of symbols/ Explication des symboles/ Erläuterung der Symbole**

| | | |
|---|---|---|
| REF — Catalogue number / Référence catalogue / Bestellnummer | 2 °C – 8 °C — Temperature limitation / Limites de température / Zulässiger Temperaturbereich | Use by / Utiliser avant / Verwendbar bis |
| IVD — In vitro diagnostic medical device / Dispositif médical de diagnostic in vitro / In-vitro-Diagnostikum | Σ — Contains sufficient for <n> tests / Contenu suffisant pour <n> tests / Inhalt ausreichend für <n> Tests | Manufacturer / Fabricant / Hersteller |
| Consult instructions for use / Voir les instructions d'utilisation / Gebrauchsanweisung beachten | LOT — Batch code / Numéro de lot / Chargenbezeichnung | |



Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17